

Attorney Docket No.: 03806.0500
Customer Number: 22,852

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Françoise LECLERCQ et al.

Serial No.: 09/783,981

Filed: February 16, 2001

Group Art Unit: 1645

Examiner:

For: Process for Preparing Functionalized Polyalkyleneimines, Compositions
Containing Them and Uses Thereof

CLAIM FOR PRIORITY

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231


Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119, Applicant(s) hereby claim the
benefit of the filing date of French Patent Application No. 0002059, filed February 18,
2000, for the above-identified U.S. patent application.

In support of this claim for priority, enclosed is one certified copy of the
priority application.

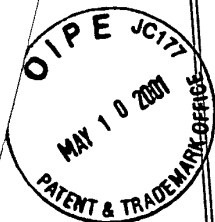
Respectfully submitted,
FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

By:


Ernest F. Chapman
Reg. No. 25,961

Date: May 10, 2001
EFC/FPD/peg
Enclosure

LAW OFFICES
FINNEGAN, HENDERSON,
FARABOW, GARRETT,
& DUNNER, L.L.P.
1300 I STREET, N. W.
WASHINGTON, DC 20005
202-408-4000







BREVET D'INVENTION



CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 13 FEV. 2001

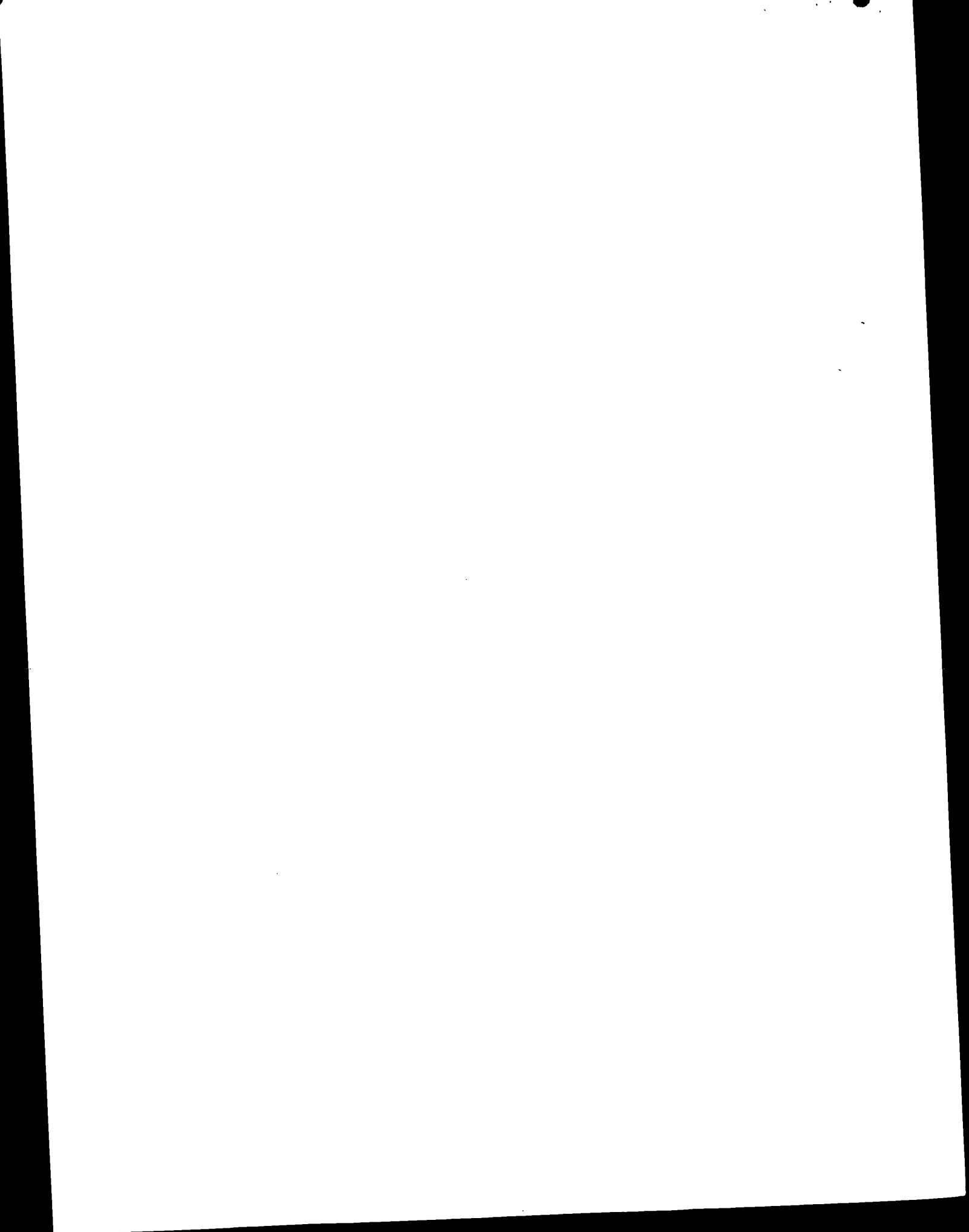
Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature, likely of Martine Planche, is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30
<http://www.inpi.fr>



18 FEV 2000 Réservé à l'INPI

75 INPI PARIS

LIEU

N° D'ENREGISTREMENT
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0002059

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE
PAR L'INPI

18 FEV. 2000

Vos références pour ce dossier
(facultatif) ST00006

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

**1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

AVENTIS PHARMA S.A
Direction Brevets
20 avenue Raymond Aron
92165 ANTONY CEDEX

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

☐

ou demande de certificat d'utilité initiale

☐

Transformation d'une demande de
brevet européen

☐

Demande de brevet initiale

☐

Date / /

Date / /

Date / /

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

PROCEDE DE PREPARATION DE POLYALKYLENIMINES FONCTIONNALISES, COMPOSITIONS LES
CONTENANT ET LEURS UTILISATIONS.

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date / /

N°

Pays ou organisation

Date / /

N°

Pays ou organisation

Date / /

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

☐ S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale

AVENTIS PHARMA S.A.

Prénoms

Forme juridique

S.A.

N° SIREN

3 . 0 . 4 . 4 . 6 . 3 . 2 . 8 . 4

Code APE-NAF

Adresse

Rue

20 avenue Raymond Aron

Code postal et ville

92160 ANTONY

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

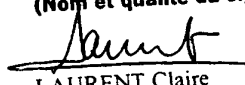

N° de téléphone (facultatif)

01 55 71 71 71

N° de télécopie (facultatif)

01 47 02 50 14

Adresse électronique (facultatif)

18 FEV 2006 REMISE DES PIÈCES DATE 75 INPI PARIS LIEU N° D'ENREGISTREMENT 0002059 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réserve à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		ST00006	
6 MANDATAIRE			
Nom	LAURENT		
Prénom	Claire		
Cabinet ou Société	AVENTIS PHARMA S.A.		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel	PG8488		
Adresse	Rue	20 avenue Raymond Aron	
	Code postal et ville	92160	ANTONY
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>	01 55 71 73 26		
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>	01 55 71 72 91		
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>	claire.laurent@aventis.com		
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)  LAURENT Claire		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DÉPARTEMENT DES BREVETS

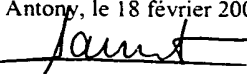
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.

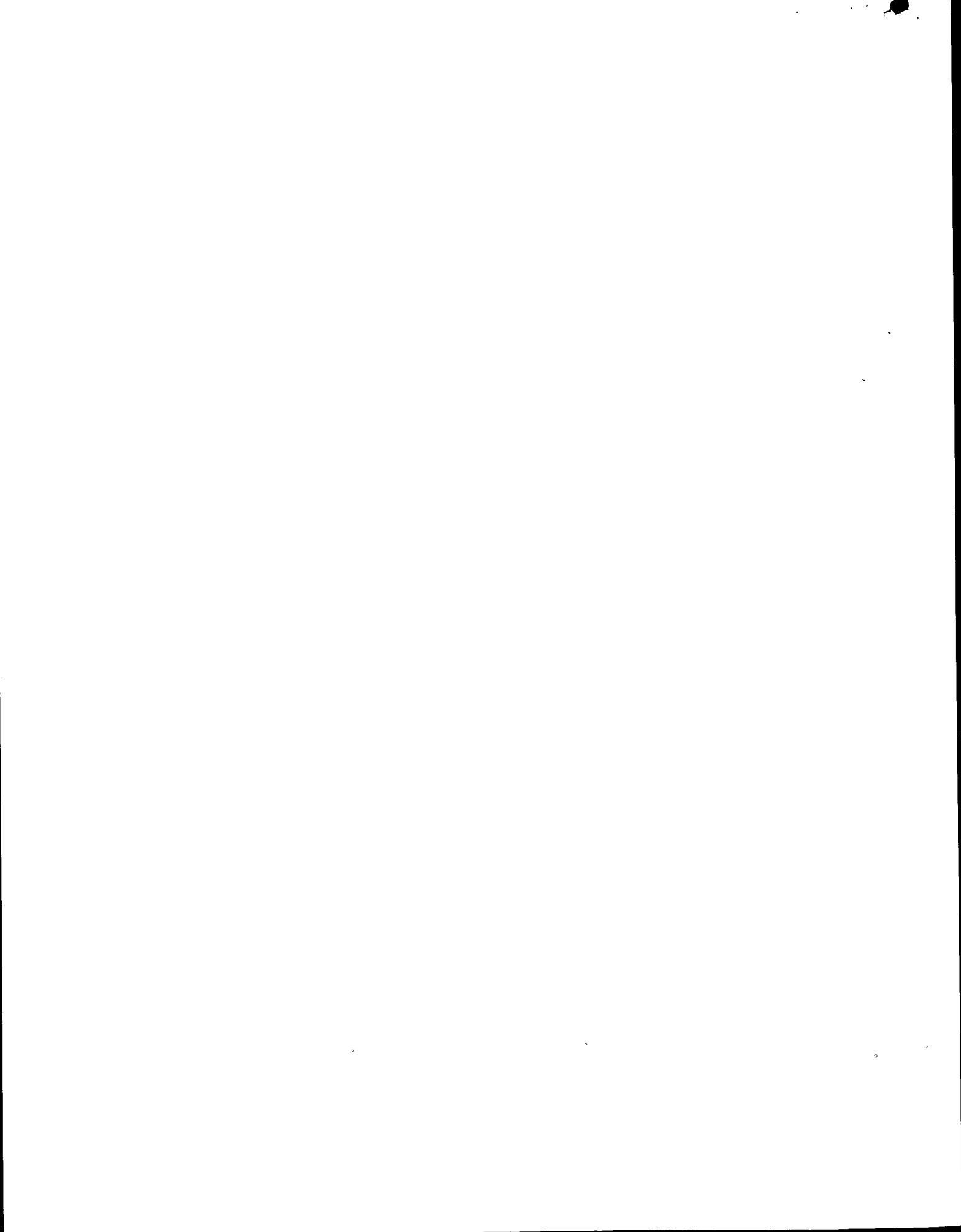
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		ST00006	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		000 2059	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE DE PREPARATION DE POLYALKYLENIMINES FONCTIONNALISES, COMPOSITIONS LES CONTENANT ET LEURS UTILISATIONS.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : AVENTIS PHARMA S.A. 20 avenue Raymond Aron - 92160 ANTONY (FR)			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		LECLERC	
Prénoms		Françoise	
Adresse	Rue	12 avenue de Bures-Cottage	
	Code postal et ville	91440	BURES SUR YVETTE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		HERSCOVICI	
Prénoms		Jean	
Adresse	Rue	14 rue du Chateau des Rentiers	
	Code postal et ville	75013	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		SCHERMAN	
Prénoms		Daniel	
Adresse	Rue	10 rue Erard	
	Code postal et ville	75012	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Antony, le 18 février 2000  LAURENT Claire		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> RIHNE-BOULENG ROBER S.A. Fondé de Pouvoir </div>	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



PROCÉDÉ DE PRÉPARATION DE POLYALKYLÈNIMINES
FONCTIONNALISÉS, COMPOSITIONS LES CONTENANT ET LEURS
UTILISATIONS

La présente invention se rapporte à un procédé de préparation de
5 polyalkylènimines fonctionnalisés qui sont utiles pour la formulation d'acides
nucléiques destinés à être transfectés dans des cellules.

Avec le développement des biotechnologies, la possibilité de transférer
efficacement des acides nucléiques dans les cellules est devenue une technique de base
avec de nombreuses applications biotechnologiques. Il peut s'agir du transfert d'acides
10 nucléiques dans des cellules *in vitro*, par exemple pour la production de protéines
recombinantes, ou au laboratoire pour l'étude de la régulation de l'expression des
gènes, le clonage de gènes ou tout autre manipulation impliquant l'ADN. Il peut
également s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *in vivo*, par exemple
pour la réalisation de vaccins, des études de marquage ou également des approches
15 thérapeutiques. Il peut encore s'agir du transfert de gènes dans des cellules prélevées
d'un organisme, en vue de leur réadministration ultérieure, par exemple pour la
création d'animaux transgéniques.

Actuellement, le moyen le plus répandu pour transférer des gènes dans des
cellules est l'utilisation de vecteurs viraux. Mais ceux-ci n'étant pas complètement
20 dénués de risques, plusieurs autres méthodes basées sur l'emploi de vecteurs
synthétiques ont été proposées. Ces vecteurs synthétiques ont deux fonctions
principales : complexer et compacter l'acide nucléique à transfecter, et promouvoir son
passage à travers la membrane plasmique et éventuellement à travers les deux
membranes nucléaires.

25 Plusieurs familles de vecteurs synthétiques ont ainsi été proposées. Parmi
celles-ci, les polymères cationiques tels que les polyalkylènimines sont particulièrement
intéressants. Ils se sont montrés en effet relativement efficaces lors de la transfection
d'acides nucléiques, notamment *in vivo*, et qu'ils présentent en outre une toxicité
relativement faible. Il a également été observé que les complexes qu'ils forment avec
30 les acides nucléiques (également appelés « polyplexes ») diffusent relativement bien
hors du site d'injection (J.S. Remy et al. ; *Advanced Drug Delivery Reviews*, 30, 1998,
pp. 85-95).

ORIGINAL

Par ailleurs, il semble à ce jour essentiel de pouvoir disposer de vecteurs capables de cibler un acide nucléique approprié vers un organe, un tissu, un type cellulaire ou encore un compartiment cellulaire spécifique, car il est important de pouvoir s'assurer que l'acide nucléique transfecté interagit efficacement avec les
5 cellules cibles sans diffuser défavorablement dans le reste de l'organisme. Le but visé est d'éviter toute action non-spécifique des acides nucléiques sur des cellules autres que les cellules cibles. Il a ainsi été montré que le polyéthylènimine galactosylé est un vecteur efficace pour le transfert *in vitro* de plasmides dans les cellules portant le récepteur cellulaire (lectine) correspondant au galactose (Zanta et al., *Bioconj. Chem.*,
10 8(2), 1997, p. 839 ; T. Bettinger et al., *Bioconj. Chem.*, 1999).

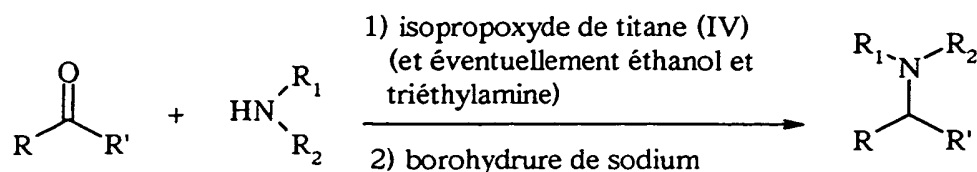
Jusqu'à présent, les polymères tels que par exemple le polyéthylènimine galactosylé, étaient obtenus par action d'un oligosaccharide avec le polyéthylènimine en présence de cyanoborohydrure de sodium. Cependant, ce réactif présente l'inconvénient d'être coûteux et surtout très toxique. Le risque d'une présence
15 potentielle d'ions cyanure résiduels dans le produit final qui est relativement cationique interdit toute possibilité d'utilisation pharmaceutique. En outre, la recherche d'un procédé de préparation alternatif est restée jusque-là infructueuse car les polyalkylénimines sont des polymères - et non pas des petites molécules - qui sont insolubles dans de nombreux solvants, notamment les solvants apolaires. Ainsi,
20 l'utilisation d'un procédé alternatif mettant en œuvre du triacétoxyborohydrure de sodium n'a pas été possible. L'utilisation de borohydrure de sodium dans l'acide sulfurique aqueux et le mélange pyridine-borane s'est également révélée incompatible avec les polymères cationiques. Il apparaissait donc nécessaire de mettre au point un procédé alternatif compatible avec les polymères cationiques de type
25 polyalkylénimines, et qui n'implique que des réactifs pharmaceutiquement acceptables.

Il a ainsi été trouvé qu'il est possible de préparer des polyalkylénimines fonctionnalisés par traitement d'un polyalkylénimine par un hémiacétal fonctionnalisé en présence d'isopropoxyde de titane (IV) et de borohydrure de sodium.

Un tel procédé présente l'avantage de pouvoir être mis en œuvre dans un
30 solvant compatible avec les polyalkylénimines comme par exemple les alcools et n'implique que des réactifs à la fois moins coûteux et peu toxiques.

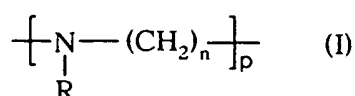
Dans différents articles de Bhattacharyya et al. (*J. Org. Chem.*, 1995, 60, pp. 4928-4929 ; *Synlett*, 1995, pp. 1079-1080 ; *J. Chem. Soc.*, Perkin Trans. 1, 1998, pp.

2527-2531) le procédé de préparation d'amines à partir de cétones ou d'aldéhydes suivant avait été décrit :

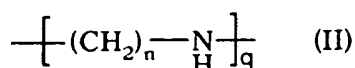


où R et R' représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un
 5 groupe alkyle, un aryle ou forment ensemble un groupe cycloalkyle à 5, 6 ou 7
 chaînons contenant éventuellement un hétéroatome, et R₁ et R₂ représentent
 indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe alkyle
 éventuellement substitué par un hydroxy ou un ester, ou bien R₁ et R₂ forment
 10 ensemble un groupe cycloalkyle à 5 ou 6 chaînons contenant éventuellement un
 hétéroatome. Cependant, un tel procédé n'était décrit que dans le cadre de la
 préparation de petites molécules, c'est-à-dire en particulier des molécules non-
 polymériques, contenant une seule fonction amine à partir de la cétone ou de
 l'aldéhyde correspondant.

Selon la présente invention, le polyalkylènimine de départ a pour formule
 15 générale :



dans laquelle R représente un atome d'hydrogène ou bien un groupe de formule
 générale :



20 n est un nombre entier compris entre 2 et 10 inclus,
 et p et q sont des nombres entiers, étant entendu que la somme p+q est telle que le
 poids moléculaire moyen du polymère est compris entre 100 et 10⁷ Da inclus.

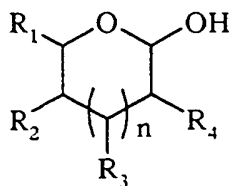
Il est entendu que dans la formule générale (I), la valeur de n et le groupe R
 peuvent varier entre les différents motifs -NR-(CH₂)_n- et -(CH₂)_n-NH-. Ainsi, la
 25 formule générale (I) regroupe à la fois des polymères linéaires et des polymères
 branchés, ainsi que des homopolymères et des hétéropolymères.

De préférence, n est compris entre 2 et 5. Des polymères préférés sont par exemple le polyéthylèneimine (PEI) ou le polypropylèneimine (PPI). En outre, les polymères préférés pour la mise en œuvre de la présente invention et qui se sont montrés tout particulièrement efficaces en transfection sont ceux dont le poids moléculaire moyen est compris entre 10^3 et $5 \cdot 10^6$. A titre d'exemple, on peut citer le polyéthylèneimine de poids moléculaire moyen 50 000 Da (PEI 50K), 25 000 Da (PEI 25K), 22 000 Da (PEI 22K), ou encore le polypropylèneimine 800 000 Da (PPI 800K).

Les polyalkylèneimines utilisés dans la présente invention peuvent être obtenus selon différentes méthodes connues de l'homme de l'art. Ils peuvent par exemple être synthétisés chimiquement à partir du ou des monomères correspondants, en condition de polymérisation anionique (par exemple polymérisation de l'éthylèneimine), ou par réduction de polyamides obtenus par polycondensation de diacides ou de diamines, ou encore par réduction d'imes obtenues par polycondensation de dialdéhydes avec des diamines. En outre, de nombreux polyalkylèneimines sont accessibles commercialement, comme par exemple le PEI 25K, le PEI 22K ou encore le PPI 800K.

On entend au sens de l'invention par « polyalkylèneimine fonctionnalisé » des polymères cationiques de type polyalkylèneimine sur lesquels des éléments de ciblage sont liés de façon covalente. Ces éléments de ciblage permettent d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers certains types cellulaires, certains tissus ou encore certains compartiments cellulaires souhaités. La liaison covalente entre l'élément de ciblage et le polyalkylèneimine est obtenue par réaction avec un hémiacétal fonctionnalisé, c'est-à-dire un hémiacétal dont l'un des substituants est ledit élément de ciblage, dans les conditions réactionnelles énoncées précédemment.

Plus précisément, on entend par hémiacétal fonctionnalisé au sens de la présente invention, toute molécule ayant pour formule générale :



dans laquelle n est égal à 0 ou 1, et R_1 , R_2 , R_3 et R_4 sont identiques ou différents et représentent indépendamment les uns des autres un atome d'hydrogène, un groupe

compatible avec la réaction mise en œuvre ou bien un élément de ciblage, étant entendu que un et un seul substituant parmi R_1 , R_2 , R_3 et R_4 est un élément de ciblage.

A titre d'exemple de groupe compatible, on peut citer les hydroxy, les alkyles ayant 1 à 4 atomes de carbone (1 à 4 C) ou encore les hydroxyalkyles (1 à 4 C).

5 L'élément de ciblage peut être soit directement greffé sur l'hémiacétal, soit il est greffé par l'intermédiaire d'une molécule de liaison bifonctionnelle (également appelée « linker »). Le « linker » permet le greffage dudit élément de ciblage sur l'hémiacétal, greffage qui pourrait autrement ne pas être possible d'un point de vue chimique, et/ou permet d'éloigner ledit élément de ciblage de l'hémiacétal. Par
10 molécule de liaison bifonctionnelle, on entend toute molécules comportant au moins une fonction qui peut se lier covalamment à l'élément de ciblage et au moins une fonction qui peut se lier covalamment à l'hémiacétal.

Au sens de l'invention, on entend par élément de ciblage toute molécule qui permet d'orienter le transfert de l'acide nucléique. Cet élément de ciblage peut être un
15 élément de ciblage extracellulaire permettant d'orienter le transfert de l'ADN vers certains, types cellulaires ou certains tissus souhaités (cellules tumorales, cellules hépatiques, cellules hématopoiétiques...). Il peut également s'agir d'un élément de ciblage intracellulaire permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers certains compartiments cellulaires privilégiés (mitochondries ou noyau par exemple).

20 Parmi les éléments de ciblage utilisables dans le cadre de l'invention, on peut citer les sucres, les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les lipides, les neuromédiateurs, les hormones, les vitamines ou leurs dérivés. Préférentiellement, il s'agit par exemple de sucres, de peptides ou de protéines tels que des anticorps ou des fragments d'anticorps, des ligands de récepteurs cellulaires ou des fragments de ceux-
25 ci, des récepteurs ou encore des fragments de récepteurs. En particulier, il peut s'agir de ligands de récepteurs de facteurs de croissance, de récepteurs de cytokines, de récepteurs de type lectines cellulaires, ou de ligands à séquence RGD avec une affinité pour les récepteurs de protéines d'adhésion comme les intégrines. On peut également citer les récepteurs de la transferrine, des HDL et des LDL, ou le transporteur du
30 folate. L'élément de ciblage peut également être un sucre permettant de cibler des lectines tels que les récepteurs aux asialoglycoprotéines ou aux sialylés tel que le Sialyl Lewis X, ou encore un fragment Fab d'anticorps, ou un anticorps simple chaîne (ScFv). A titre d'exemple, ledit sucre peut être choisi parmi les mono-, di- ou tri-

saccharides. Il peut s'agir par exemple de galactose, mannose, fucose, rhamnose, lactose, ou encore de maltose.

Généralement, on effectue la réaction dans un solvant alcoolique, par exemple le méthanol ou l'éthanol, à température comprise entre 100°C et 30°C. De préférence,
 5 on opère dans l'éthanol à température ambiante, c'est-à-dire à température comprise entre 18°C et 25°C.

En outre, on utilise généralement entre 25 et 100 moles d'isopropoxyde de titane (IV) par mole de polymère introduit, et plus préférentiellement entre 40 et 60 moles d'isopropoxyde de titane (IV) par mole de polymère.

10 On introduit également dans le mélange réactionnel une quantité de borohydrure de sodium égale à 50 à 80 % (molaire) de la quantité d'isopropoxyde de titane (IV) utilisée.

La quantité d'hémiacétal fonctionnalisé utilisée pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention dépend du taux de greffage que l'on souhaite obtenir.
 15 Avantagemment, on utilise entre 6 et 100 moles d'hémiacétal fonctionnalisé par mole de polymère.

Selon la quantité d'hémiacétal fonctionnalisé mis en œuvre, on obtient des polyalkylénimines fonctionnalisés à des taux qui peuvent varier entre 1% et 20%, et de préférence entre 4% et 20%. Dans le cas de l'utilisation d'un sucre à titre d'élément de
 20 ciblage, le pourcentage de sucres greffés sur le polyalkylénimine peut être déterminé précisément en utilisant la méthode au résorcinol. Cette méthode consiste à traiter le polyalkylénimine fonctionnalisé qui a été préalablement dialysé avec du résorcinol et de l'acide sulfurique, puis on chauffe à 90°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, l'absorbance à 495 nm est mesurée et comparée à un échantillon de
 25 référence (solution standard). La dialyse permet d'éliminer les éléments de ciblage non-greffés, et la mesure faite en comparaison d'un échantillon de référence permet de déterminer la quantité d'éléments de ciblage greffés. Cette méthode constitue par ailleurs l'un des moyens les plus sûrs pour caractériser le produit obtenu, car s'agissant de polymères, il n'est pas possible de les caractériser par RMN (Résonnance
 30 Magnétique Nucléaire) ou par mesure de masse comme cela se fait classiquement sur des petites molécules.

Le procédé selon la présente invention est particulièrement intéressant, car il constitue un procédé alternatif à la fois peu coûteux et peu toxique, pour préparer des vecteurs de transfert d'acides nucléiques capables de cibler certains tissus, certains types cellulaires ou certains compartiments cellulaires spécifiques. En outre, il a été
 5 remarqué que les polyalkylènimines fonctionnalisés par des sucres sont moins toxiques vis-à-vis des cellules que les polyalkylènimines non-fonctionnalisés.

Les polyalkylènimines fonctionnalisés sont utiles pour la transfection d'acides nucléiques dans les cellules. Dans ce but, les polyalkylènimines fonctionnalisés sont mélangés à un ou plusieurs acides nucléiques de façon à former des complexes
 10 également appelés « polyplexes » (on peut alors parler de « polyfection » plutôt que de transfection). Afin d'obtenir une efficacité de transfection optimale, les proportions de polyalkylènimine fonctionnalisé et d'acide nucléique sont choisies de préférence de sorte que le polyplexe formé est globalement neutre ou légèrement positif. D'une manière générale, on choisit lesdites proportions de façon à former des polyplexes
 15 positifs et ne précipitant pas, sans pour autant augmenter de façon trop importante la cationicité des polyplexes formés car cela augmente aussi la toxicité. Lesdites proportions doivent ainsi être déterminées au cas par cas. Cependant, lesdites proportions sont généralement choisies de sorte que le rapport molaire entre les amines du polyalkylènimine fonctionnalisé et les phosphates de l'acide nucléique est
 20 compris entre 0,1 et 50, de préférence entre 0,5 et 20. Bien entendu, ce rapport peut être aisément adapté et optimisé par l'homme du métier en fonction du polyalkylènimine fonctionnalisé utilisé, de l'acide nucléique, de la cellule cible, du mode d'administration, ou encore selon les applications envisagées (notamment le type de cellules à transfecter).

25 Dans les polyplexes tels que décrits ci-avant, l'acide nucléique peut être aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences naturelles ou artificielles, et notamment d'ADN génomique (ADNg), d'ADN complémentaire (ADNc), d'ARN messenger (ARNm), d'ARN de transfert (ARNt), d'ARN ribosomique (ARNr), de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou
 30 semi-synthétiques, d'oligonucléotides modifiés ou non. Ces acides nucléiques peuvent être par exemple d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, ou virale. Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes

incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent être modifiés chimiquement.

Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin de même que des oligonuléotides courts ou des séquences plus longues. En particulier, les acides nucléiques sont avantageusement constitués par exemple par des plasmides, des vecteurs, des épisomes, ou encore des cassettes d'expression. Ces acides désoxyribonucléiques peuvent notamment porter une origine de réplication fonctionnelle ou non dans la cellule cible, un ou plusieurs gènes marqueurs, des séquences régulatrices de la transcription ou de la réplication, des gènes d'intérêt thérapeutique, des séquences antisens modifiées ou non, ou encore des régions de liaison à d'autres composants cellulaires.

De préférence, l'acide nucléique comprend un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique sous contrôle de séquences de régulation, par exemple un ou plusieurs promoteurs et un terminateur transcriptionnel actifs dans les cellules cibles.

Au sens de l'invention, on entend par gène d'intérêt thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique ainsi codé peut être notamment une protéine ou un peptide. Ce produit protéique peut être exogène homologue ou endogène vis-à-vis de la cellule cible, c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie. Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène d'intérêt thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant par exemple une stabilité accrue ou une activité modifiée. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut à titre d'exemple citer les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines (par exemple les interleukines, les interférons, ou le TNF : FR 92/03120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques (par exemple BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF,

VEGF, NT3, NT5, ou HARP/pléiotrophine) les apolipoprotéines (par exemple ApoAI, ApoAIV, ou ApoE : FR 93/05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 91/11947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs (par exemple p53, Rb, Rap1A, DCC, ou k-rev : FR 93/04745), les gènes
 5 codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation (par exemple les Facteurs VII, VIII, IX), les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), les gènes de l'hémoglobine ou d'autres transporteurs protéiques, les enzymes du métabolisme ou du catabolisme.

L'acide nucléique d'intérêt thérapeutique peut également être un gène ou une
 10 séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les gènes thérapeutiques comprennent également
 15 les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capables de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre,
 20 l'invention permet la réalisation soit de vaccins soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des micro-organismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, du "syncytia forming virus", d'autres virus
 25 ou encore de peptides antigéniques spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences permettant l'expression du gène d'intérêt thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces
 30 séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du

génomique de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, ou RSV. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par exemple par addition de séquences d'activation ou de régulation. Il peut aussi s'agir de promoteur, inductible ou répressible.

Les polyplexes ainsi formés peuvent être formulés en vue d'administrations par exemple par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, intratrachéale, ou intrapéritonéale. De préférence, les polyplexes formés contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acides nucléiques utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. En ce qui concerne plus particulièrement le mode d'administration, il peut s'agir soit d'une injection directe dans les tissus, par exemple au niveau des tumeurs, ou dans les voies circulatoires, soit d'un traitement de cellules en culture suivi de leur réimplantation *in vivo*, par injection ou greffe. Les tissus concernés dans le cadre de la présente invention sont par exemple les muscles, la peau, le cerveau, les poumons, le foie, la rate, la moelle osseuse, le thymus, le coeur, la lymphe, le sang, les os, les cartilages, le pancréas, les reins, la vessie, l'estomac, les intestins, les testicules, les ovaires, le rectum, le système nerveux, les yeux, les glandes, ou les tissus conjonctifs.

Les compositions comprenant les polyplexes tels que décrits ci-avant peuvent être utilisées pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules. Plus précisément, lesdites compositions peuvent être utilisées pour la préparation d'un médicament destiné à traiter les maladies, en particulier les maladies qui résultent d'une déficience en un produit protéique ou nucléique.

Une méthode pour transférer des acides nucléiques dans des cellules consiste à effectuer les étapes suivantes :

- (1) la formation d'une composition comprenant les polyplexes tels que décrits ci-avant, et
- (2) la mise en contact des cellules avec la composition formée en (1).

Outre les dispositions qui précèdent, la présente invention comprend également d'autres caractéristiques et avantages qui ressortiront des exemples et figures qui suivent, et qui doivent être considérés comme illustrant l'invention sans en limiter la portée.

FIGURES

Figure 1 : histogramme représentant l'activité luciférase en RLU/ μ g de protéines (RLU : « Relative Light Unit » c'est-à-dire unité de lumière relative) dans les cellules ECV304 pour différentes formulations polyalkylènimine glycosylé/ADN à des rapports de charges (+/-) variant de 3 à 28.

La courbe en trait continu noir représente le pourcentage de survie cellulaire selon le rapport de charges (+/-) entre le polyalkylènimine glycosylé et l'ADN pour chaque formulation [3a], [3b], [4a] et [4b] utilisée.

Figure 2 : histogramme représentant l'activité luciférase en RLU/ μ g de protéines (RLU : « Relative Light Unit » c'est-à-dire unité de lumière relative) dans les cellules HeLa pour différentes formulations polyalkylènimine glycosylé/ADN à des rapports de charges (+/-) variant de 3 à 28.

La courbe en trait continu noir représente le pourcentage de survie cellulaire selon le rapport de charges (+/-) entre le polyalkylènimine glycosylé et l'ADN pour chaque formulation [3a], [3b], [4a] et [4b] utilisée.

Figure 3 : histogramme représentant l'activité luciférase en RLU/ μ g de protéines (RLU : « Relative Light Unit » c'est-à-dire unité de lumière relative) dans les cellules HepG2 pour différentes formulations polyalkylènimine glycosylé/ADN à des rapports de charges (+/-) variant de 3 à 28.

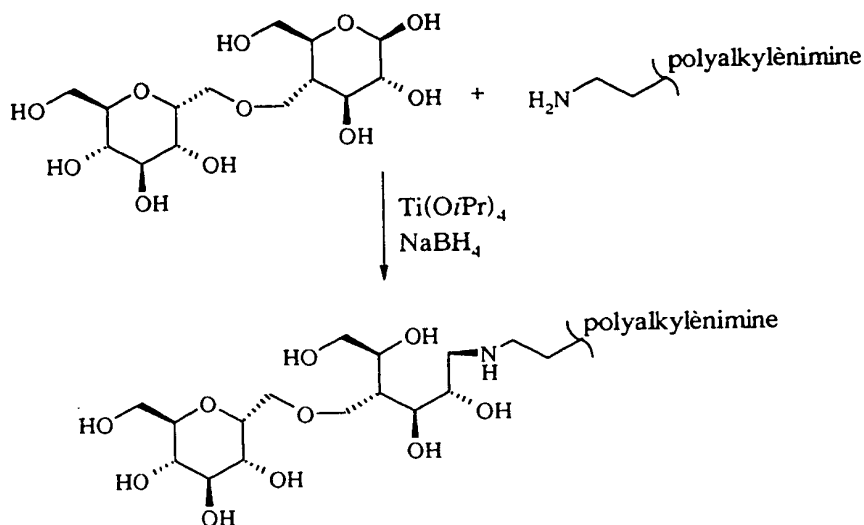
La courbe en trait continu noir représente le pourcentage de survie cellulaire selon le rapport de charges (+/-) entre le polyalkylènimine glycosylé et l'ADN pour chaque formulation [3a], [3b], [4a] et [4b] utilisée.

Figure 4 : Représentation schématique, du plasmide pXL2774 utilisé dans les expériences de transfert d'ADN dans les cellules.

EXEMPLES

Exemple 1 : préparation de PEI-maltose 4% [3a]

La réaction mise en œuvre peut être écrite schématiquement de la façon suivante :



- 5 0,02 mmol de PEI 25 KDa (500 mg, de chez Aldrich) sont dissoutes dans 20 ml d'éthanol anhydre. 0,7 mmol de maltose (252 mg) sont ensuite ajoutées et la solution ainsi obtenue est mélangée sous atmosphère d'azote pendant 15 minutes. 1 mmol d'isopropoxyde de Titane IV (0,3 ml) est ajoutée lentement au mélange réactionnel et on maintient sous agitation pendant une nuit. Puis on ajoute 0,75 mmol de
- 10 borohydrure de sodium (28,5 mg) et on continue l'agitation pendant 8 heures. Le mélange réactionnel est ensuite filtré et concentré à 10 ml. La solution résultante est finalement dialysée pendant 12 heures (membrane d'exclusion de taille 12000). Le rendement est de 80%.

- Le pourcentage de résidus de maltose greffés est déterminé par la méthode au
- 15 résorcinol précédemment décrite : 23 résidus maltose se sont greffés sur le PEI 25 KDa, correspondant à un taux de greffage des groupements amino de 4 %.

Exemple 2 : préparation de PEI-maltose 12% [3b]

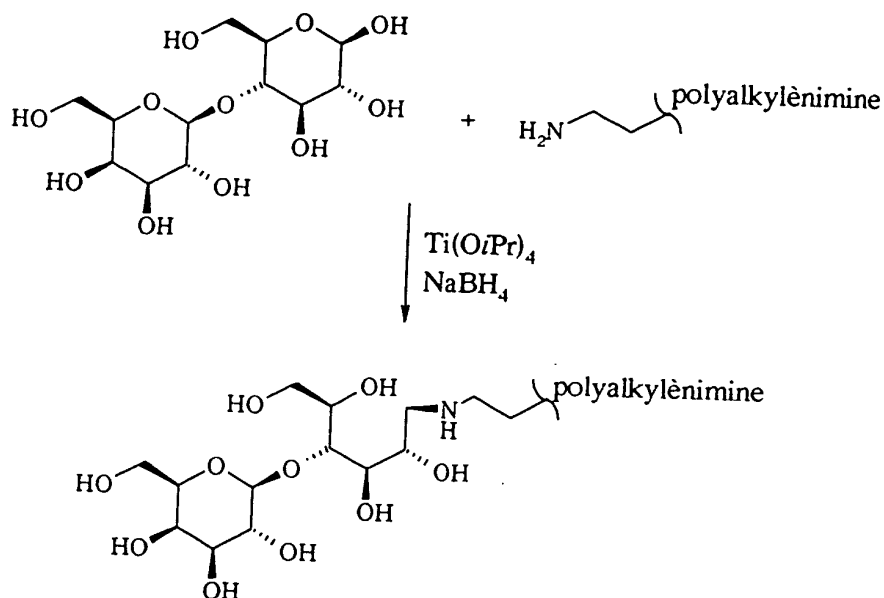
- 0,02 mmol de PEI 25 KDa (500 mg, de chez Aldrich) sont dissoutes dans 20 ml d'éthanol anhydre. 2 mmol de maltose (720 mg) sont ensuite ajoutées et la solution
- 20 ainsi obtenue est mélangée sous atmosphère d'azote pendant 15 minutes. 2,7 mmol d'isopropoxyde de Titane IV (0,8 ml) sont ajoutées lentement au mélange réactionnel

et on maintient sous agitation pendant une nuit. Puis on ajoute 2 mmol de borohydrure de sodium (76 mg) et on continue l'agitation pendant 8 heures. Le mélange réactionnel est ensuite filtré et concentré à 10 ml. La solution résultante est finalement dialysée pendant 12 heures (membrane d'exclusion de taille 12000). Le rendement est de 80%.

- 5 Le pourcentage de résidus de maltose greffés est déterminé par la méthode au résorcinol précédemment décrite : 70 résidus maltose se sont greffés sur le PEI 25 KDa, correspondant à un taux de greffage des groupements amino de 12 %.

Exemple 3 : préparation de PEI-lactose 6% [4a]

La réaction mise en œuvre peut être écrite schématiquement de la façon suivante :



10

- 0,02 mmol de PEI 25 KDa (500 mg, de chez Aldrich) sont dissoutes dans 20 ml d'éthanol anhydre. 1 mmol de lactose (360 mg) est ensuite ajoutée et la solution ainsi obtenue est mélangée sous atmosphère d'azote pendant 15 minutes. 1,35 mmol d'isopropoxyde de Titane IV (0,4 ml) sont ajoutées lentement au mélange réactionnel et on maintient sous agitation pendant une nuit. Puis on ajoute 1 mmol de borohydrure de sodium (38 mg) et on continue l'agitation pendant 8 heures. Le mélange réactionnel est ensuite filtré et concentré à 10 ml. La solution résultante est finalement dialysée pendant 12 heures (membrane d'exclusion de taille 12000). Le rendement est de 80%.
- 15

Le pourcentage de résidus de lactose greffés est déterminé par la méthode au résorcinol précédemment décrite : 35 résidus lactose se sont greffés sur le PEI 25 KDa, correspondant à un taux de greffage des groupements amino de 6 %.

Exemple 4 : préparation de PEI-lactose 17% [4b]

- 5 0,02 mmol de PEI 25 KDa (500 mg, de chez Aldrich) sont dissoutes dans 20 ml d'éthanol anhydre. 3 mmol de lactose (1080 mg) sont ensuite ajoutées et la solution ainsi obtenue est mélangée sous atmosphère d'azote pendant 15 minutes. 4 mmol d'isopropoxyde de Titane IV (1,2 ml) sont ajoutées lentement au mélange réactionnel et on maintient sous agitation pendant une nuit. Puis on ajoute 3 mmol de borohydrure
10 de sodium (114 mg) et on continue l'agitation pendant 8 heures. Le mélange réactionnel est ensuite filtré et concentré à 10 ml. La solution résultante est finalement dialysée pendant 12 heures (membrane d'exclusion de taille 12000). Le rendement est de 80%.

- 15 Le pourcentage de résidus de lactose greffés est déterminé par la méthode au résorcinol précédemment décrite : 99 résidus lactose se sont greffés sur le PEI 25 KDa, correspondant à un taux de greffage des groupements amino de 17 %.

Exemple d'utilisation : transfection *in vitro* d'ADN plasmidique complexé au PEI-maltose 4% et 12% ou au PEI-lactose 6% et 17% dans différents types cellulaires.

- 20 Cet exemple illustre la capacité des polyalkylénimines fonctionnalisés synthétisés ci-avant à transfecter l'ADN dans les cellules.

- L'ADN utilisé est le plasmide pXL2774 en solution dans un mélange de chlorure de sodium 150 mM à une concentration de 80 µg/ml. Ce plasmide contient le gène luc codant pour la luciférase sous contrôle du promoteur CMV du cytomégalo virus. Sa
25 taille est de 4500 bp. Le schéma de ce plasmide est représenté à la figure 4. Le plasmide pXL2774 a été purifié selon les méthodes décrites dans la demande de brevet WO 97/35002.

- 30 Les polyplexes sont préparés par mélange volume à volume d'une solution de plasmide pXL2774 avec une solution de PEI fonctionnalisé dilué dans l'eau à des concentrations variables selon le rapport de charge souhaité.

Des microplaques de 24 puits sontensemencées avec 60000 cellules HeLa (ATCC) par puit, et transfectées 24 heures plus tard. 50 µl de la solution de polyplexes sont

ajoutés goutte à goutte dans chaque puit. En l'absence de sérum, le milieu était au préalable supplémenté par du SVF (sérum de veau foetal) 2 heures avant la transfection. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 4 heures. Le milieu contenant les complexes est ensuite enlevé et remplacé par un mélange de DMEM et de 10% de sérum de veau foetal. Puis, les cellules sont à nouveau mises en culture pendant 24 heures. Enfin, les cellules sont lysées et testées en utilisant un kit de test de luciférase (Promega) et un luminomètre Dynex MLX. En outre, la toxicité des polyplexes a été évaluée par mesure des concentrations du lysat cellulaire et exprimée en activité enzymatique par µg de protéines du lysat.

Les résultats indiqués aux figures 1, 2 et 3 rendent compte de l'efficacité de transfection avec les différents PEI fonctionnalisés synthétisés ci-avant pour des rapports de charges avec l'ADN variables et dans 3 lignées cellulaires différentes.

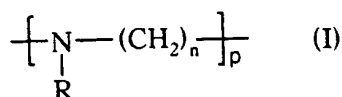
On constate globalement que l'efficacité de transfert est relativement élevée sauf lorsque l'on utilise des polyplexes formés à partir de PEI à haut taux de greffage (efficacité avec le PEI-maltose 12% moins élevée qu'avec le PEI-maltose 4% et efficacité avec le PEI-lactose 17% moins élevée qu'avec le PEI-lactose 6%). Le taux de greffage est donc un paramètre qu'il est important d'optimiser selon les applications envisagées.

En outre, il a été constaté que la substitution des groupes amino par un hémiacétal fonctionnalisé réduit de façon significative la toxicité induite par le PEI vis-à-vis des cellules, en particulier à rapport de charge avec l'ADN élevé. En effet, le pourcentage de survie des cellules (figures 1, 2 et 3) reste beaucoup plus élevé que celui qu'on obtient avec l'utilisation de PEI non-fonctionnalisé pour transfecter l'ADN (résultat non-montré).

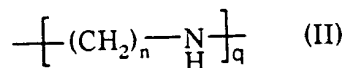
Ainsi, cet exemple montrent que les polyalkylénimines fonctionnalisés obtenus par le procédé selon la présente invention, qui est sûr et peu coûteux, sont de bons candidats pour la transfection d'ADN dans les cellules.

REVENDECATIONS

1. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés caractérisé en ce que l'on traite un polyalkylènimine par un hémiacétal fonctionnalisé en présence d'isopropoxyde de titane (IV) et de borohydrure de sodium.
- 5 2. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on opère dans un solvant alcoolique.
3. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 2 caractérisé en ce que ledit solvant alcoolique est le méthanol ou l'éthanol.
4. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 10 1 caractérisé en ce que l'on opère en outre à température comprise entre 10 et 30°C.
5. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on utilise entre 25 et 100 moles d'isopropoxyde de titane (IV) par mole de polyalkylènimine.
6. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 15 1 caractérisé en ce que l'on utilise une quantité de borohydrure de sodium égale à 50 à 80 % (molaire) de la quantité d'isopropoxyde de titane (IV) utilisée.
7. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on utilise entre 6 et 100 moles d'hémiacétal fonctionnalisé par mole de polyalkylènimine.
- 20 8. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 1 caractérisé en ce que le polyalkylènimine de départ a pour formule générale :



dans laquelle R représente un atome d'hydrogène ou bien un groupe de formule générale :



25

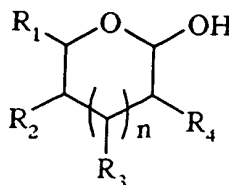
n est un nombre entier compris entre 2 et 10 inclus,

et p et q sont des nombres entiers, étant entendu que la somme p+q est telle que le poids moléculaire moyen du polymère est compris entre 100 et 10^7 Da inclus.

9. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 8 caractérisé en ce que ledit polyalkylènimine de départ est le polyéthylènimine (PEI) ou le polypropylènimine (PPI).

10. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 9 caractérisé en ce que ledit polyalkylènimine de départ est choisi parmi le polyéthylènimine de poids moléculaire moyen 50 000 Da ou 25 000 Da ou 22 000 Da ou le polypropylènimine de poids moléculaire moyen 800 000 Da.

11. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'hémiacétal fonctionnalisé a pour formule générale :



dans laquelle n est égal à 0 ou 1, et R_1 , R_2 , R_3 et R_4 sont identiques ou différents et représentent indépendamment les uns des autres un atome d'hydrogène, un groupe compatible avec la réaction mise en œuvre ou bien un élément de ciblage, étant entendu que un et un seul substituant parmi R_1 , R_2 , R_3 et R_4 est un élément de ciblage.

12. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 11 caractérisé en ce que ledit groupe compatible est choisi parmi les hydroxy, les alkyles ayant 1 à 4 atomes de carbone (1 à 4 C) ou encore les hydroxyalkyles (1 à 4 C).

13. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 11 caractérisé en ce que ledit élément de ciblage est choisi parmi les sucres, les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les lipides, les neuromédiateurs, les hormones, les vitamines ou leurs dérivés.

14. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 13 caractérisé en ce que ledit élément de ciblage est choisi parmi les ligands de récepteurs de facteurs de croissance, de récepteurs de cytokines, de récepteurs de type

lectines cellulaires, les ligands à séquence RGD avec une affinité pour les récepteurs de protéines d'adhésion comme les intégrines, les récepteurs de la transferrine, les HDL les LDL, le transporteur du folate, le Sialyl Lewis X, les fragments Fab d'anticorps, les anticorps simple chaîne (ScFv), les mono-, di- ou les tri-saccharides.

5 15. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 14 caractérisé en ce que ledit saccharide est choisi parmi le galactose, le mannose, le fucose, le rhamnose, le lactose, ou encore le maltose.

10 16. Procédé de préparation de polyalkylènimines fonctionnalisés selon la revendication 1 caractérisé en ce que le pourcentage d'hémiacétals fonctionnalisés greffés sur le polyalkylènimine est compris entre 1% et 20%.

17. Composition comprenant au moins un polyalkylènimine fonctionnalisé obtenu par le procédé selon la revendication 1 et au moins un acide nucléique.

18. Composition selon la revendication 17 caractérisée en ce que ledit acide nucléique est un acide désoxyribonucléique ou un acide ribonucléique.

15 19. Composition selon la revendication 18 caractérisée en ce que ledit acide nucléique comprend un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique sous contrôle de séquences de régulation.

20. Utilisation d'une composition selon la revendication 17 pour la préparation d'un médicament destiné à la transfection des cellules.

20 21. Utilisation d'une composition selon la revendication 17 pour le transfert d'acides nucléique dans des cellules.

22. Méthode de transfert d'acides nucléiques dans des cellules comprenant les étapes suivantes :

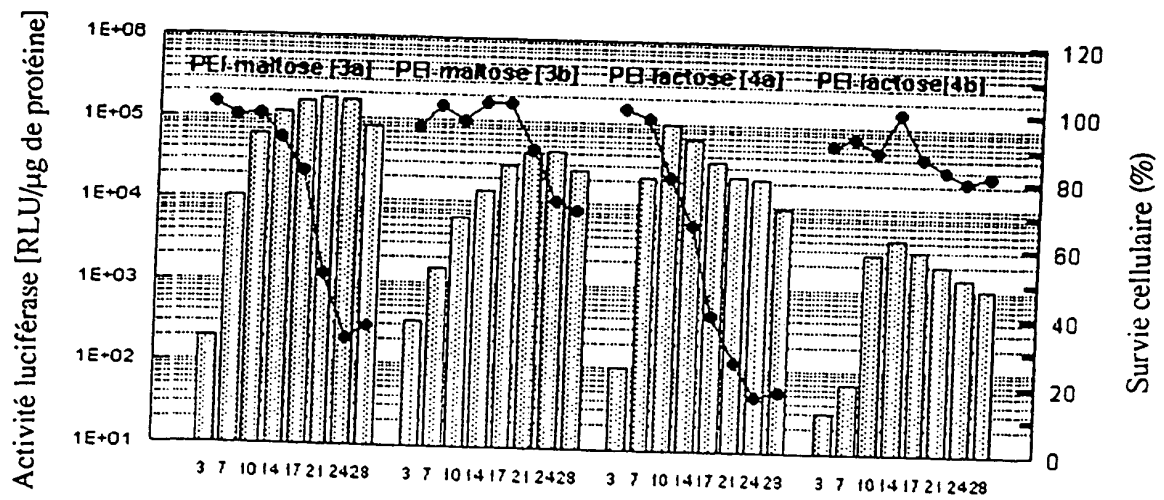
(1) la formation d'une composition telle que définie à la revendication 17, et

25 (2) la mise en contact des cellules avec la composition formée en (1).

ORIGINAL

FIG. 1

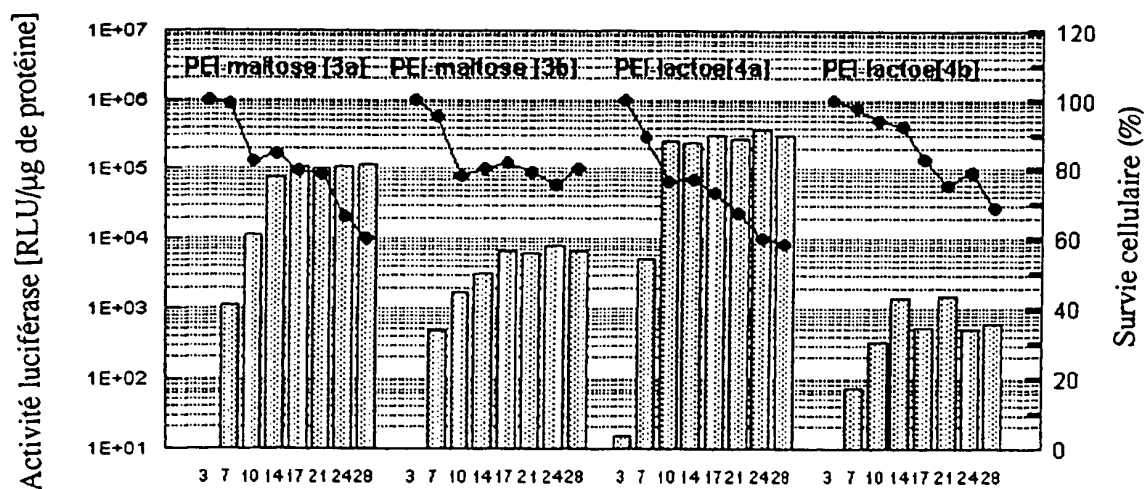
Cellules ECV304



ORIGINAL

FIG. 2

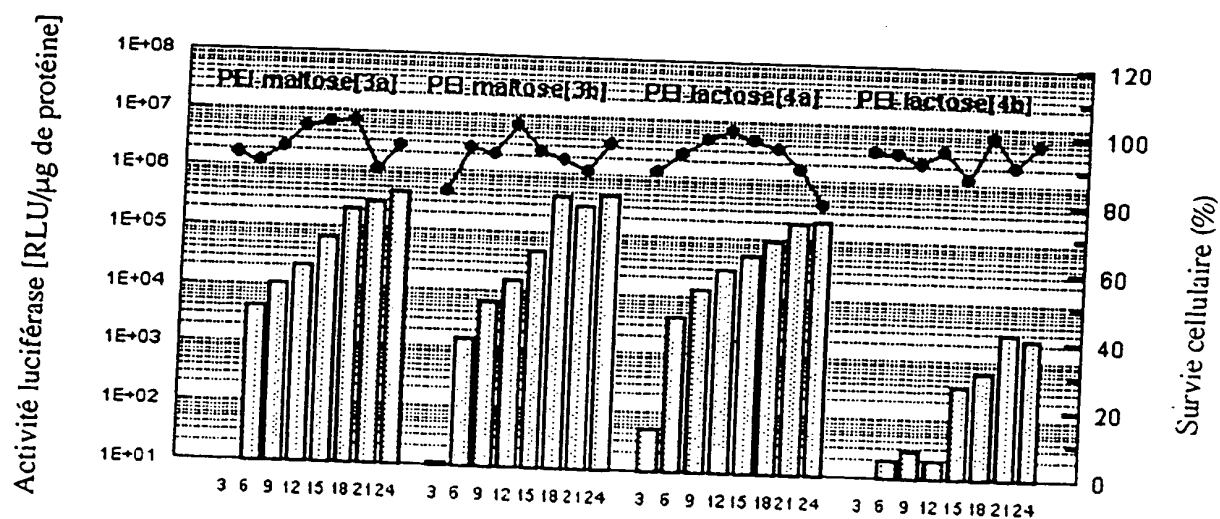
Cellules Hela



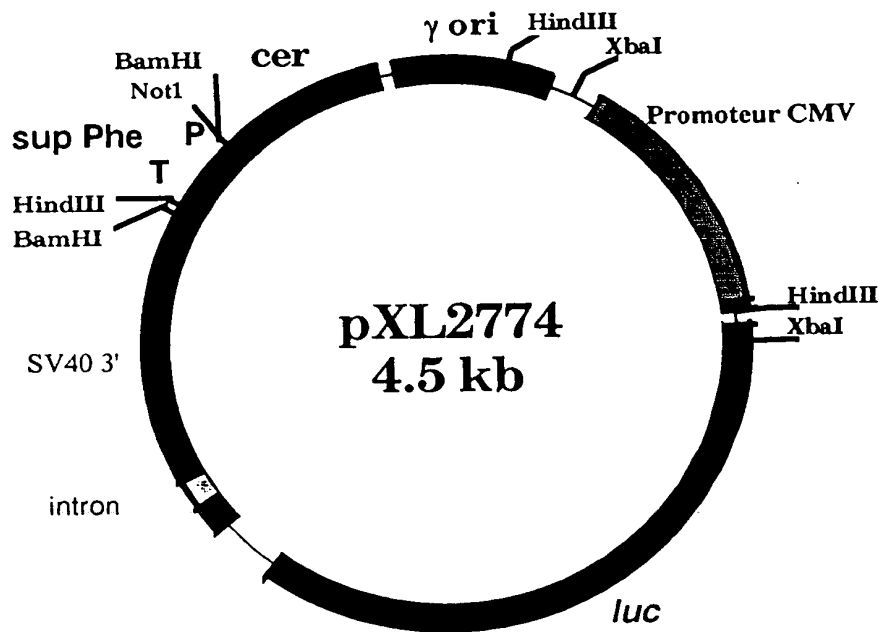
ORIGINAL

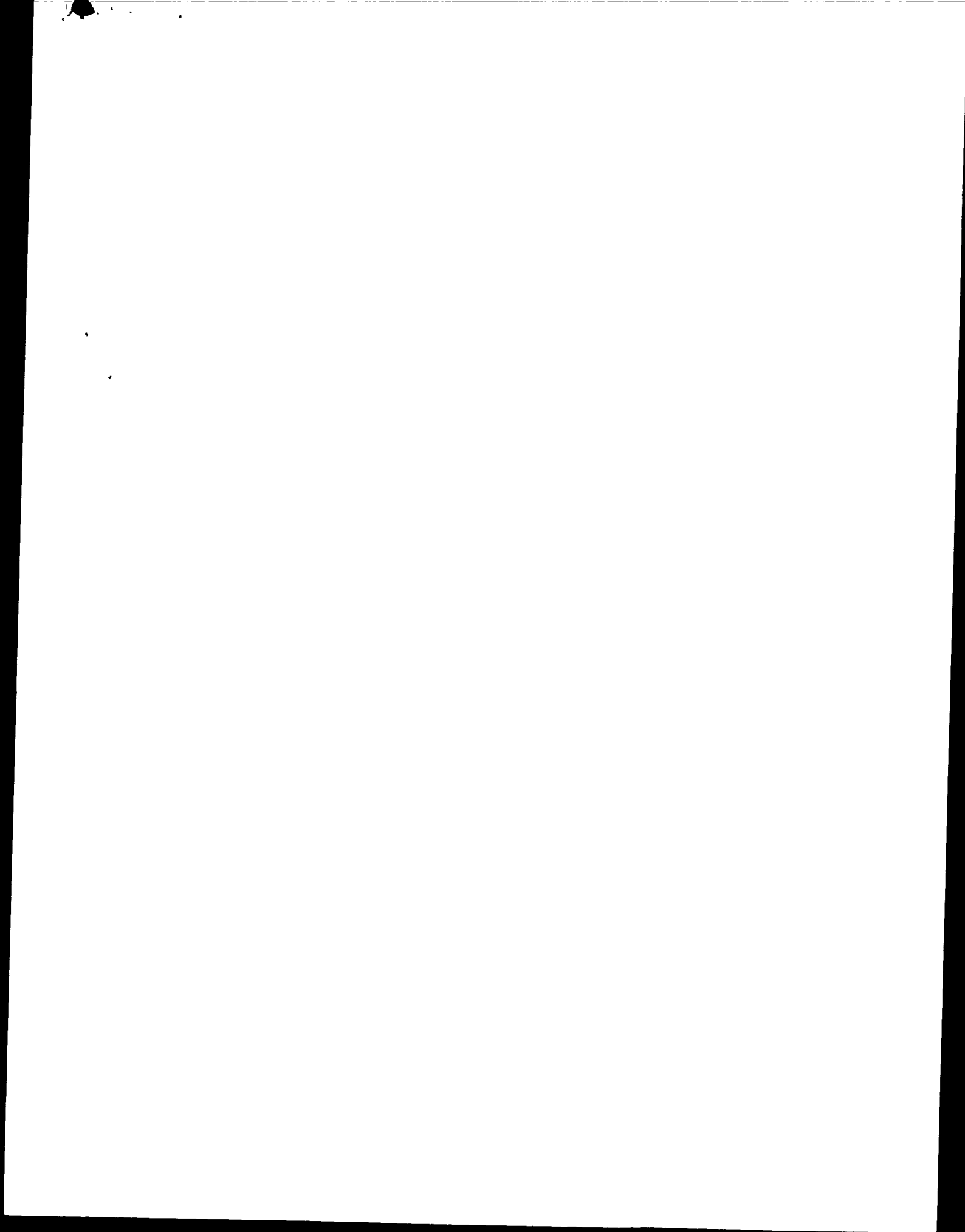
FIG. 3

Cellules HepG2



ORIGINAL

FIG. 4**ORIGINAL**



FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

1300 I Street, N.W.
Washington, D.C. 20005
202/408-4000

SERIAL NO:

09/783,981

DOCKET NO:

3806.500